

【原著・基礎】

小児急性中耳炎の中耳貯留液と上咽頭分離肺炎球菌とインフルエンザ菌の一致性

岸井こずゑ・千葉菜穂子・諸角美由紀・濱野（長谷川）恵子・生方 公子

北里大学大学院感染制御科学府病原微生物分子疫学研究室*

(平成 20 年 9 月 26 日受付・平成 20 年 12 月 15 日受理)

小児急性中耳炎に対する tebipenem pivoxil 臨床試験時において、中耳貯留液と上咽頭ぬぐい液の両方から肺炎球菌あるいはインフルエンザ菌の同一菌種が同時に分離された症例を対象とし、それらの菌が果たして同一であるのか否かを、①遺伝子学的薬剤耐性型、②荚膜型、③ pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) による DNA 切断パターンの相同性から検討した。小児急性中耳炎例 399 例のうち、中耳貯留液と上咽頭ぬぐい液の両方の検体から同一の遺伝子型の菌株が分離された症例は、肺炎球菌が 107 例、インフルエンザ菌が 99 例であった。中耳貯留液中の菌量が多かった症例では、上咽頭ぬぐい液中の菌量も多かった。このことから、上咽頭の細菌とその菌量を調べることにより、急性中耳炎の原因菌を類推することが可能であると結論された。

Key words: acute otitis media, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, PFGE

小児における急性中耳炎は、6 歳までの小児の 70% が罹患するといわれるほど一般的な疾患である。その背景には、乳幼児における免疫学的な未熟性や耳管構造、機能の未発達があるといわれる¹⁾。急性中耳炎の原因菌としては、*Streptococcus pneumoniae* (肺炎球菌) の割合が最も高く、次いで *Haemophilus influenzae* (インフルエンザ菌) であり、その他に *Moraxella catarrhalis* (モラキセラ菌) や *Streptococcus pyogenes* (GAS) 等が挙げられる¹⁾。また、これらの菌は常在菌としての一面も有し、健常小児の上咽頭に常在菌として存在することも多いが、宿主抵抗力が低下した際には、上咽頭で増殖し、鼻腔から耳管をとおして中耳へ侵入し、急性中耳炎を発症させる。加えて、耐性化した肺炎球菌やインフルエンザ菌による中耳炎の反復例や難治例の増加が大きな問題となっている¹⁾。

一方、急性中耳炎の診断と治療においては、鼓膜切開術や鼓膜穿刺による排膿は非常に重要である。耳鼻咽喉科外来ではこのような外科的処置が可能であるが、小児科外来では不可能に近い状況にある。しかし、急性中耳炎は乳幼児の急性上気道炎に続発することが多く、そのため急性中耳炎の原因菌を把握するうえで、上咽頭の細菌検査は有用であるといわれている²⁾。また、肺炎や気管支炎などの下気道感染症においても、急性中耳炎を併発している例もしばしば経験される。

つまり、中耳由来の検査材料(検体)から分離された細菌と、上咽頭から分離される菌が生物学的に同一であるか否かを調べることは、原因菌不明の急性中耳炎、あるいは中耳由来の検体が採取しがたい症例での上咽頭検索の意味を明確にするうえで、有益と思われる。

先に、tebipenem pivoxil (TBPM-PI) の臨床試験時にお

ける迅速診断法について記したが、TBPM-PI の急性中耳炎を対象とした臨床試験では中耳貯留液と上咽頭ぬぐい液の 2 つの検体について、real-time PCR と培養による原因微生物の検索が同時に行われた。その結果、原因菌が判明した急性中耳炎例のうち、肺炎球菌とインフルエンザ菌による感染例が 92.4% を占めていることが明らかにされた。

本論文においては、中耳貯留液と上咽頭ぬぐい液から同時に分離された肺炎球菌とインフルエンザ菌について、①耐性遺伝子型、②荚膜型、および③ PFGE による疫学解析を行い、中耳からの分離菌が上咽頭から分離された菌と同一であったのか否かを検証し、上咽頭の検索結果で急性中耳炎の原因菌が果たしてどこまで類推できるのかを検討した。ここではその成績について報告する。

I. 対象と方法

1. 対象症例と菌株

菌株は、2006 年 10 月から 2008 年 1 月の間に実施された TBPM-PI の小児臨床第 III 相試験の一般臨床試験 (OS) ならびに比較試験 (DB) において収集された肺炎球菌およびインフルエンザ菌を対象とした。中耳貯留液と上咽頭ぬぐい液の両方の検体から肺炎球菌が同時に分離された症例は 111 例 (OS : 47 例, DB : 64 例)、同様にインフルエンザ菌が分離された症例は 105 例 (OS : 48 例, DB : 57 例) であった。中耳貯留液から分離された菌は、いずれも急性中耳炎の原因菌と判定されている。

2. PCR による遺伝子検索

PCR による肺炎球菌の菌種同定と耐性遺伝子検索は、すでに報告した方法に準じ、6 組のプライマーを使用し

*東京都港区白金 5-9-1

Table 1. Isolation status of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* in middle ear fluid and nasopharyngeal swabs

Clinical sample	<i>S. pneumoniae</i>	<i>H. influenzae</i>
middle ear fluid and nasopharyngeal swabs	111 (95.7%)	105 (93.7%)
middle ear fluid	5 (4.3%)	7 (6.3%)
Total	116	112

て行った³⁻⁵⁾。

肺炎球菌とインフルエンザ菌について、これらの遺伝子レベルで解析された耐性型は、genotype の g を付して表現した。すなわち、肺炎球菌では penicillin-susceptible *Streptococcus pneumoniae* (gPSSP), penicillin-intermediate *S. pneumoniae* (gPISP), penicillin-resistant *S. pneumoniae* (gPRSP) のように表記した。なお、gPISP および gPRSP については耐性にかかわる遺伝子変異がわかるように gPISP (*pbp2x*), gPISP (*pbp2b*), gPISP (*pbp1a+2x*), gPISP (*pbp2x+2b*), gPRSP (*pbp1a+2x+2b*) と表記した⁶⁻⁸⁾。

一方、インフルエンザ菌の解析にも 6 組のプライマーを使用した。すなわち、① P6 膜蛋白をコードする *p6* 遺伝子用⁹⁾, ② TEM 型 β -lactamase をコードする *bla*_{TEM-1} 遺伝子用¹⁰⁾, ③ ROB 型 β -lactamase をコードする *bla*_{ROB-1} 遺伝子用¹¹⁾, ④ PBP3 をコードする *ftsI* 遺伝子上の Asn₅₂₆ の Lys へのアミノ酸置換用¹²⁾, ⑤ Asn₅₂₆Lys と Ser₃₈₅Thr の 2 か所のアミノ酸置換用¹³⁾, そして⑥ 莢膜 type b 型遺伝子用¹⁴⁾である。これらの遺伝子解析結果を元に、遺伝子学的変異の認められなかった株 (β -lactamase-nonproducing ampicillin-susceptible *Haemophilus influenzae*) は gBLNAS, β -lactamase 産生株 (β -lactamase-producing ampicillin-resistant *H. influenzae*) は gBLPAR, ampicillin (ABPC) 軽度耐性株 (Low- β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant *H. influenzae*) は gLow-BLNAR, ABPC 耐性株 (β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant *H. influenzae*) は gBLNAR, gLow-BLNAR 株の β -lactamase 産生株 (β -lactamase-producing amoxicillin/clavulanic acid-resistant *H. influenzae*) は gBLPACR-I, gBLNAR 株のそれは gBLPACR-II と表記した。

3. 血清型別

肺炎球菌の血清型は、菌と抗血清との quellung reaction (膨化反応) により決定した。使用した抗血清は Statens Serum Institute (Copenhagen, Denmark) から購入した。

4. PFGE 解析

インフルエンザ菌に対する PFGE 解析は、すでに報告された方法に若干の変更を加えて実施した¹⁵⁾。

被験菌はチョコレート寒天培地 (日本ベクトンディッキンソン (株)) で 37°C, 20 時間, 15% 炭酸ガス培養を

行い, 2 mL の saline-EDTA (0.15 M NaCl, 10 mM EDTA [pH8.0]) に 3×10^8 CFU/mL とするよう混釈した。次いで, 7,000 rpm, 4°C, 5 分の遠心操作で集菌後, さらに saline-EDTA にて菌の洗浄を 2 回行った。その後, 菌体は 250 μ L の Pet IV (1 M NaCl, 10 mM EDTA [pH8.0]) に均一化し, その 1.6 倍量の 2% アガロース (InCert agarose; FMC Bioproducts, Rockland, ME) を加えて混合後, ただちに incert mold に流し入れ, 4°C に 20 分間放置した。固化した寒天ブロックは細片化した後, 1 mL 中に 0.05 mg の lysozyme を含む Lysis solution (1 M NaCl, 0.1 M EDTA [pH8.0], 10 mM Tris-HCl [pH8.0], 0.5% Brij58, 0.2% sodium deoxycholate, 0.5% sarkosyl) にて 37°C, 1 時間の溶菌操作を行った。次いで, 1 mL 中に 0.2 mg の proteinase K を含む ES buffer (0.25 M EDTA [pH 8.0], 1% sarkosyl) にて 50°C, 17 時間の処理を行った。

翌日, 反応液を除去し, 寒天ブロックは 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を含む TE buffer (10 mM Tris-HCl [pH8.0], 0.1 M EDTA [pH8.0]) で 3 時間の処理を行った。その後, 同じ TE buffer で 15 分ごとに 3 回の洗浄を繰り返した。溶液を 0.1 mM TE buffer 3 mL に置換後, 制限酵素 *Sma*I 用の buffer にて 30 分処理, 続いて最終濃度が 30 U になるように *Sma*I を加えた buffer にて 30°C, 16 時間の酵素反応を行い, DNA を切断した。電気泳動は CHEF MAPPER (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を使用し, 14°C, 6 V/cm の条件で 20 時間行った。

II. 結 果

1. 中耳貯留液と上咽頭ぬぐい液の培養成績

Table 1 には, 肺炎球菌とインフルエンザ菌のいずれかが中耳貯留液から分離された症例について, 上咽頭ぬぐい液からも同一菌種が分離されていたか否かについての成績を示す。

肺炎球菌では, 116 例中 111 例 (95.7%) で両方の検体から本菌が分離されていた。しかし, 残りの 5 例 (4.3%) では, 中耳貯留液のみで本菌が陽性であった。これらの症例について検体採取前の状況を調べたところ, 前投与薬として clarithromycin (CAM) を処方されていた例が 1 例, 「前投与薬なし」が 4 例で, 必ずしも前投与薬の影響ではなかった。

一方, インフルエンザ菌では, 112 例中 105 例 (93.7%) で両検体から同時に菌が分離されていた。中耳貯留液のみ同菌が陽性であった例は 7 例 (6.3%) 認められた。前投与抗菌薬は amoxicillin (AMPC) が 1 例, CAM が 2 例, 「前投与薬なし」が 4 例であった。

2. 中耳貯留液由来肺炎球菌の薬剤耐性型

中耳貯留液から分離された肺炎球菌 (n=111) について, *pbp* 遺伝子解析によって識別された耐性型の内訳を Fig. 1 に示す。

全症例のうち, gPISP (*pbp2x*) 株が分離された症例が

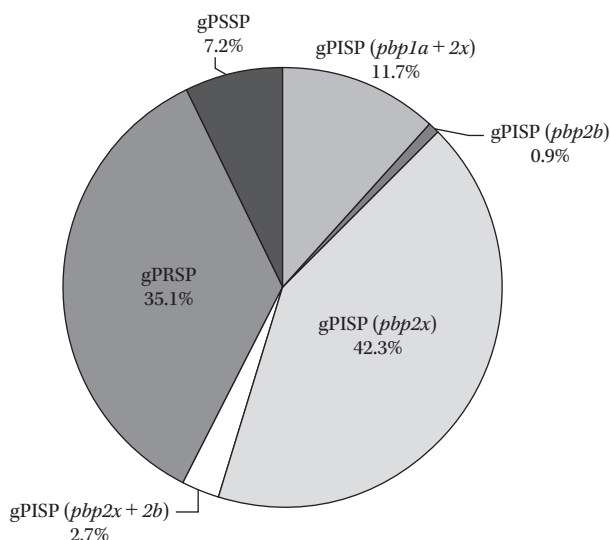


Fig. 1. Resistance gene type of *S. pneumoniae* isolated from middle ear fluid (n = 111).

47例(42.3%)と最も多く、gPRSP (*pbp1a + 2x + 2b*)株分離の39例(35.1%)を上廻っていた。

3番目に多かったのは、gPISP (*pbp1a + 2x*)株の13例(11.7%)で、その他にgPISP (*pbp2x + 2b*)株が3例(2.7%)とgPISP (*pbp2b*)株が1例(0.9%)認められた。gPSSP株分離例は、わずか8例(7.2%)にすぎなかった。

3. 中耳貯留液由来インフルエンザ菌の薬剤耐性型

中耳貯留液から分離されたインフルエンザ菌について、耐性遺伝子解析から識別された耐性型の内訳をFig. 2に示す。

105例中、gBLNARが分離された症例は52例(49.5%)と多く、gLow-BLNARは7例(6.7%)、gBLPACR-IIは2例(1.9%)であった。耐性菌が全体の58.1%を占めていた。

4. 中耳貯留液と上咽頭ぬぐい液における菌量の関係

Table 2には、中耳貯留液の培養による菌量と上咽頭ぬぐい液の培養による菌量との関係について、肺炎球菌とインフルエンザ菌それぞれの成績を示す。

これら2菌種における両検体での菌量の関係をみると、肺炎球菌では統計学的に有意差がみられ、上咽頭ぬぐい液における菌量が多いほど、中耳貯留液の菌量も多いという結果であった($\chi^2=12.0507$, $P=0.0170$ (*)。インフルエンザ菌でも上咽頭ぬぐい液の菌量と中耳貯留液の菌量は相関する傾向が認められたが、有意差は認められなかった($\chi^2=8.6275$, $P=0.0711$)。

5. 中耳貯留液と上咽頭からの分離菌における薬剤耐性型、莢膜型、PFGEパターンの同一性

1) 肺炎球菌

中耳貯留液ならびに上咽頭から同時に肺炎球菌が分離された111例について、両者が同一菌とみなされるか否かを、①遺伝子レベルからの薬剤耐性型、②莢膜型から

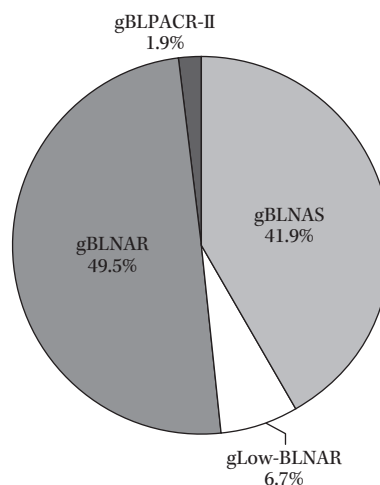


Fig. 2. Resistance gene type of *H. influenzae* isolated from middle ear fluid (n = 105).

検討した。111例中、大多数の107例(96.4%)で両検査材料由来株は一致していた。4例(3.6%)のみが両検査材料から分離された菌株の莢膜型が不一致であった。それらの不一致例はいずれも中耳貯留液から分離された菌量が少ない症例であった。

2) インフルエンザ菌

中耳貯留液と上咽頭ぬぐい液から分離されたインフルエンザ菌が同一であったのか否かは、gBLNARが50%近くを占めるために耐性型のみでは識別できない。このため、両方の検査材料からインフルエンザ菌が同時に分離された105例分について、PFGEによる解析を行った。Fig. 3には、それらの成績のなかから27症例の成績を示す。

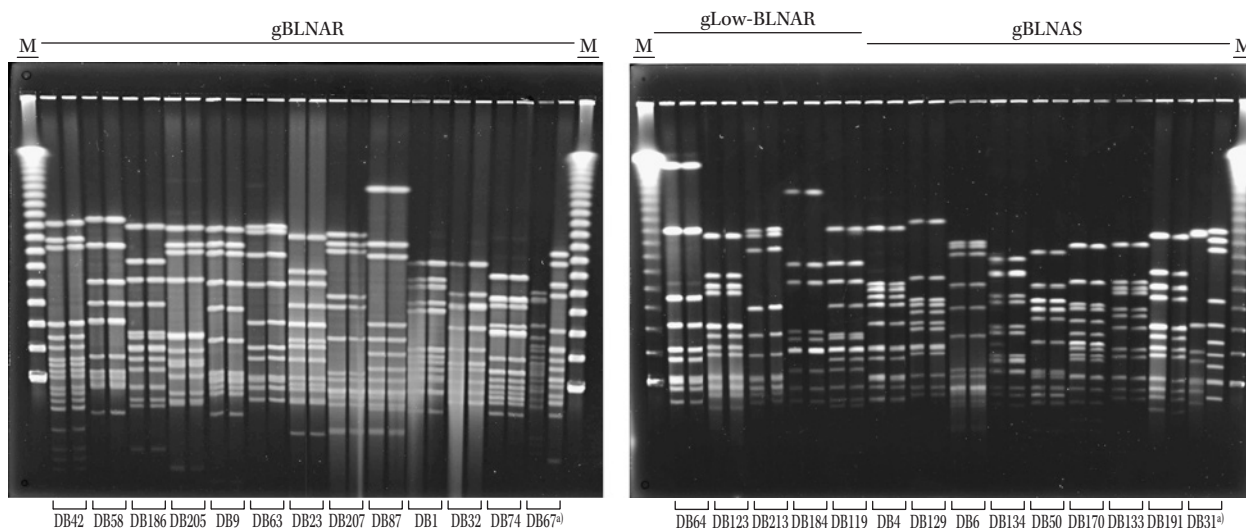
それぞれの症例について、中耳貯留液由来株と上咽頭由来株とを並べて泳動した結果、図からも明らかのように、遺伝子レベルで識別した耐性型が一致している場合には、ほとんどの症例において上咽頭に見いだされたインフルエンザ菌と同一の菌が中耳貯留液からも分離されていることが示された。しかし、なかにはDB67とDB31症例のように、耐性型は同じであっても、DNA切断パターンでは明らかに異なる菌が釣菌されていた例も認められた。

最終的に、105例中99例(94.3%)で中耳貯留液と上咽頭由来株のPFGEパターンが一致、残り6例(5.7%)は不一致という成績であった。

さらにこれらの成績で注目すべきことは、図からも明らかのように、耐性型が同じであってもPFGEパターンはそれぞれ著しく異なっていたことである。つまり、gBLNARといってもそのクローンは多様であり、異なったインフルエンザ菌でPBP3遺伝子変異が容易に選択され、耐性化が進行していることが示された。

Table 2. Bacterial content of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* in middle ear fluid and nasopharyngeal swabs

Middle ear fluid		Nasopharyngeal swabs			Statistics
		3 (+)	2 (+)	1 (+)	
<i>S. pneumoniae</i> (n = 111)	3 (+)	24 (21.6%)	5 (4.5%)	3 (2.7%)	$\chi^2 = 12.0507$ $P = 0.0170$ (*)
	2 (+)	15 (13.5%)	10 (9.0%)	7 (6.3%)	
	1 (+)	17 (15.3%)	20 (18.0%)	10 (9.0%)	
	All	91 (82.0%)	20 (18.0%)		
<i>H. influenzae</i> (n = 105)	3 (+)	19 (18.1%)	2 (1.9%)	4 (3.8%)	$\chi^2 = 8.6275$ $P = 0.0711$
	2 (+)	14 (13.3%)	10 (9.5%)	3 (2.9%)	
	1 (+)	25 (23.8%)	16 (15.2%)	12 (11.4%)	
	All	86 (82.0%)	19 (18.0%)		

3 (+): 1×10^4 CFU/sample2 (+): $1 \times 10^3 - 9.6 \times 10^3$ CFU/sample1 (+): $4 \times 10^1 - 9.6 \times 10^2$ CFU/sample

a) Strains derived from the middle ear differed from nasopharyngeal ones.

M: λ ladder molecular size markerFig. 3. PFGE analysis of *H. influenzae* isolated from middle ear fluid and nasopharyngeal swabs.

III. 考 察

小児における急性中耳炎は、急性上気道炎や下気道感染に併発（合併）することが多いといわれるが、小児科で中耳由来の検体を採取し、急性中耳炎の原因菌を検索することはそれほど容易なことではない。そのような症例において、上咽頭の細菌を検索することにより、急性中耳炎の原因菌が推定できれば、患者への負担も少なく有用と考えられる。

結果に示したように、小児急性中耳炎で、上咽頭に肺炎球菌やインフルエンザ菌が2(+)以上の菌量で存在している場合には、およそ80%の確率で、それらの菌が原因菌であろうと推定できるという成績であった (Table 2)。また、菌量が1(+)であっても、他の菌が混在せずに肺炎球菌やインフルエンザ菌が単独で上咽頭に存在している場合には、その菌を急性中耳炎の原因菌と推定し

てもほぼ差し支えないと考えられた。

一方、急性中耳炎の原因となっている肺炎球菌には耐性菌が多いといわれているが、重症あるいは中等症由来の菌が集積された今回の臨床試験では、莢膜3型のgPISP (*pbp2x*) が最も多く分離されていた。この型の菌はムコブズ中耳炎を引き起こし、その70~90%の症例が重篤な乳様突起炎を併発する菌として知られている。しかし、導入が期待されている肺炎球菌用7価 conjugate vaccine (7PCV) にはこの莢膜3型は含まれていない。7PCVが導入されたとしても、肺炎球菌による急性中耳炎感染症の動向には十分な注意が必要であろう。

他方、インフルエンザ菌においては、急性中耳炎例でもgBLNARによる症例が増加していることが示された。しかもそれらの症例では、上咽頭にもインフルエンザ菌が2(+)以上存在していた例が多い。上咽頭に存在

するインフルエンザ菌は耳管を通じて中耳へ侵入し、急性中耳炎の原因菌となっていることが示唆された。急性中耳炎が乳幼児に圧倒的に多く発症する要因として、6歳以下の小児の耳管が成人に比して太く短かつ水平に中耳へつながっているため、上咽頭で増殖した細菌は耳管を通じて中耳へ侵入しやすことがある。学童期以上になると、耳管は細くなり、また、耳管の入り口が中耳の位置よりも低くなるため、急性中耳炎には罹患しがたくなる。

PFGEでもう一つ注目されたのは、このようなインフルエンザ菌のDNA切断パターンが、耐性菌同士であっても著しく異なっていたことである。つまり、わが国において問題となっているgBLNARは、遺伝子変異を生じた*ftsI*遺伝子が次々と新たなgBLNASへとtransformされているのではなく、薬剤の選択圧によって変異を有する株が拾い出されていると考えるのが妥当である。

乳幼児の上咽頭は、侵入した肺炎球菌やインフルエンザ菌がコロナイゼーションしやすい部位でもあり、また免疫学的に未熟な児では、それらの菌に対する抗体を獲得するための部位でもある。このような背景はあるが、検査材料の採取が困難な乳幼児においては、急性中耳炎の原因菌を上咽頭の検査から高い確率で推定できると結論された。

文 献

- 1) 山中 昇：変貌する急性中耳炎，金原出版，東京，2000
- 2) 藤原啓次，保富宗城，山中 昇：中耳炎に対する抗菌薬投与法の基本的な考え方。日化療会誌 2007; 55: 201-10
- 3) Hasegawa K, Yamamoto K, Chiba N, Kobayashi R, Nagai K, Jacobs M R, et al: Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. *Microb Drug Resist* 2003; 9: 39-46
- 4) Ubukata K, Iwata S, Sunakawa K: *In vitro* activities of new ketolide, telithromycin, and eight other macrolide antibiotics against *Streptococcus pneumoniae* having *mefA* and *ermB* genes that mediate macrolide resistance. *J Infect Chemother* 2003; 9: 221-6
- 5) Ubukata K, Hasegawa K, Chiba N, Kobayashi R, Iwata S, Sunakawa K: Antibiotic susceptibility in relation to penicillin-binding protein genes and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* strains responsible for meningitis in Japan, 1999-2002. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1488-94
- 6) Dowson C G, Hutchison A, Spratt B G: Nucleotide sequence of the penicillin-binding protein 2B gene of *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 7518
- 7) Pares S, Mouz N, Pétillot Y, Hakenbeck R, Dideberg O: X-ray structure of *Streptococcus pneumoniae* PBP2x, a primary penicillin target enzyme. *Nat Struct Biol* 1996; 3: 284-9
- 8) Yamane A, Nakano H, Asahi Y, Ubukata K, Konno M: Directly repeated insertion of 9-nucleotide sequence detected in penicillin-binding protein 2B gene of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 1257-9
- 9) Nelson M B, Apicella M A, Murphy T F, Vankeulen H, Spotila L D, Rekosh D: Cloning and sequencing of *Haemophilus influenzae* outer membrane protein P6. *Infect Immun* 1988; 56: 128-34
- 10) Sutcliffe J G: Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978; 75: 3737-41
- 11) Juteau J M, Levesque R C: Sequence analysis and evolutionary perspectives of ROB-1 beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 1354-9
- 12) Fleischmann R D, Adams M D, White O, Clayton R A, Kirkness E F, Kerlavage A R, et al: Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 1995; 269: 496-512
- 13) Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, Chiba N, Hasegawa K, Takeuchi Y, et al: Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with β -lactam resistance in β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1693-9
- 14) Van Eldere J, Brophy L, Loynds B, Celis P, Hancock I, Carman S, et al: Region II of the *Haemophilus influenzae* type b capsulation locus is involved in serotype-specific polysaccharide synthesis. *Mol Microbiol* 1995; 15: 107-18
- 15) Yano H, Suetake M, Kuga A, Irinoda K, Okamoto R, Kobayashi T, et al: Pulsed-field gel electrophoresis analysis of nasopharyngeal flora in children attending a day care center. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 625-9

Coincidence of *Streptococcus Pneumoniae* or *Haemophilus Influenzae* isolated simultaneously in epipharynx and middle-ear fluids in pediatric patients with acute otitis media

Kozue Kishii, Naoko Chiba, Miyuki Morozumi,
Keiko Hamano-Hasegawa and Kimiko Ubukata

Laboratory of Molecular Epidemiology for Infectious Agents, Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato University, 5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo, Japan

We determined the identity of simultaneous isolates in 206 isolates in which *Streptococcus pneumoniae* or *Haemophilus influenzae* was isolated simultaneously from the epipharynx and middle ear fluid among pediatric patients with acute otitis media (AOM) in clinical studies of tebipenem pivoxil based on (i) genetic antibiotic resistance type, (ii) capsular type, and (iii) similarity in DNA restriction patterns by PFGE. Among 399 AOM patients, isolates from middle ear fluid and epipharynx samples of 107 cases of *S. pneumoniae* to be identical, and isolates from 99 cases identical for *H. influenzae*. Bacterial cell numbers in middle ear fluid paralleled those in the epipharynx. We concluded that the causative AOM pathogen could be determined by testing bacterial species and amounts in the epipharynx.